基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1330-04

不同剂量拉莫三嗪对体外培养海马神经细胞存活及其 BDNF 和 P-CREB 表达的影响

李佩瑾,蒋 莉,刘官信
(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察不同浓度拉莫三嗪(Lamotrigine,LTG)对体外培养海马神经细胞存活影响及脑源性神经生长因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)和磷酸化 cAMP 反应元件结合(Phosphorylated cAMP response element binding protein,p-CREB)的表达变化。从细胞水平角度探索拉莫三嗪对认知功能的可能影响。方法:取培养 8 d 的成熟海马神经细胞,随机分为拉莫三嗪低剂量组(4 mg/L)、拉莫三嗪中剂量组(8 mg/L)、拉莫三嗪高剂量处理组(12 mg/L)和空白对照组(0.1% DMSO)。维持浓度培养 4 d 后,MTT 法检测细胞存活数量,免疫组化检测神经细胞 BDNF 和 p-CREB。结果:(1)不同浓度拉莫三嗪处理组与空白对照组之间比较,细胞存活率有明显差异($P<0.05$)。而 3 个不同剂量拉莫三嗪组之间的细胞存活率没有显著差异($P>0.05$)。(2)与正常对照组比 12 mg/L 拉莫三嗪培养神经细胞,p-CREB 和 BDNF 的表达显著降低($P<0.05$),而 4、8 mg/L 拉莫三嗪剂量组无差异($P>0.05$)。(3)加入拉莫三嗪 12 mg/L 培养神经细胞 BDNF 和 p-CREB 的表达明显低于 4、8 mg/L 拉莫三嗪剂量组($P<0.05$)。结论:在 4~12 mg/L 的剂量范围内,拉莫三嗪均可造成体外培养神经细胞死亡,高浓度拉莫三嗪可通过神经细胞内 BDNF 和 p-CREB 的表达变化,影响神经细胞存活。

【关键词】拉莫三嗪;p-CREB;认知
【中国图书分类法分类号】R971+.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-16

Effect of lamotrigine of different concentration on the survival rate and the expression of BDNF and p-CREB in the cultured hippocampus neuron

LI Pei-jin, et al
(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the possible effections on neuron survival rate and the change of BDNF and p-CREB induced by different concentrations of lamotrigine. *Methods*: The hippocampus was harvested from newborn Sprague - Dawley rats. Primary hippocampal neuron cultured for 8 days in vitro were used and divided randomly into four groups: low concentration (4 mg/L) group, middle concentration (12 mg/L) group, high concentration (12 mg/L) group and 0.1%DMSO as control. The BDNF and p-CREB levels were determined by immunohistochemistry and the cell survival rate was tested by MTT. *Results*: (1)compared with that in the control group, the survival of the neuron cell in all the lamotrigine groups decreased significantly ($P<0.05$), but the differences of survival rate was not great among the three lamotrigine groups. (2) Compared with the control group, expression of BDNF and p-CREB on the cell in the high concentration group were significantly different from those in the control group($P<0.05$). (3) BDNF and p-CREB expressing on the cell in the 12 mg/L lamotrigine concentration group were significantly different from those in the 4 mg/L and 8 mg/L lamotrigine concentration group ($P<0.05$). *Conclusion*: In the lever of 4~12 mg/L, lamtrigine can cause the neural cell death in vitro and the high concentration of lamotrigine (12 mg/L) causes the cell death by changing the expression of BDNF and p-CREB

【Key words】Lamotrigine; p-CREB; Recognition

癫痫是神经科常见疾病,需长期服用抗癫痫药物(Antiepilepsy drugs, AEDs)。近年研究证实,除癫痫发作本身可造成儿童神经细胞发育不良,认知功能受损外,长期应用 AEDs,特别是传统抗癫痫药物也可造成神经细胞损害,从而影响儿童认知功能。LTG 是临床上常用的新型抗癫痫药物,是否对认知造成影响,现阶段仍存在争论[1]。为排除体内因素的

作者介绍:李佩瑾(1982-),女,硕士,
研究方向:抗癫痫药物对神经元的药理毒性作用。
通讯作者:蒋 莉,女,教授,E-mail:dr_jiangli@126.com。

影响,本实验借助培养的大鼠海马神经元,进行模拟临床用药的体外研究,探索该药物对细胞存活率和形态的影响,并通过观察细胞 p-CREB 和 BDNF 表达的变化,在细胞水平明确 LTG 对神经元的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本试验所用动物为新生 24 h 的二级 SD (Sprague-Dawley)大鼠,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 LTG,MTT,二甲基亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司;B27 培养添加液购自 Gibco 公司;抗 BDNF 抗体购自 CHEMICOM 公司;抗 p-CREB 抗体购自重庆鼎晶生物公司。

1.1.3 培养液组成 细胞培养液:基础液为 DMEM /F12:DMEM(4:1)含 10% 胎牛血清,10% 马血清,谷氨酰胺(Gln) 100 μg /L;无血清饲养培养液:基础液 DMEM/F12:DMEM (4:1)添加 Gln100 μg /L 和浓度 2% B27 培养添加液。

1.2 试验方法

1.2.1 海马神经细胞原代培养 将 SD 大鼠断颈取头,75%酒精浸泡消毒,无菌状态下 4℃左右分离出海马组织,剪成约 1 mm^3 小块,0.125% 胰酶在 37℃条件下消化 10~30 min 后,用细胞培养液终止消化并用 200 目细胞筛过滤,稀释后,以 $1\sim5\times10^5$ 个 /ml 浓度接种到浓度为 1%多聚赖氨酸包被的 24 孔培养板或 96 孔培养板中,置 37℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱培养 24 h,用 0.01 mol/L PBS 轻洗涤各培养孔后,换用等体积无血清培养液培养。以后每 2~3 d 半量换液。

1.2.2 海马神经细胞 LTG 培养处理 按 10 mg/kg 剂量给大鼠 LTG12~15 min 后,大鼠血药浓度为 5~52 μmol/L(1.28~13.32 mg/L),脑脊液浓度为血药浓度的 62%[2,3]。参照此浓度范围,我们选用不同中高剂量 LTG 进行细胞培养,即 LTG 的浓度定为 4、8、12 mg/L。用 DMSO(0.1%)配制 LTG 浓缩液,终浓度为 1 mg/L,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,4℃保存备用。细胞培养 8 d 后,加入不同剂量的 LTG 浓缩液,使其终浓度分别达到 4、8、12 mg/L,对照组仅加入浓度为 0.1%DMSO。在 37℃、5%CO_2 培养条件下培养,于细胞培养的第 12 d(加药后 4 d)在倒置相差显微镜下观察各组细胞的生长情况及其形态学变化。

1.2.3 海马神经细胞增殖活性检测 加药后 4 d,在 96 孔板中,每孔加入 20 μl MTT 溶液,37℃继续培养,4 h 后终止培养,加入 150 μl DMSO,震荡 10 min。选择波长 492 nm,以经过相同处理的空白孔调零,在酶标仪上测定各孔光密度值。

1.2.4 海马神经细胞胞体面积的测定 加药后 4 d,取不同组别的海马神经细胞在 200 倍显微镜随机选择 50 个视野,用统计学图像分析仪通过灰度分离法分别测定神经细胞胞体面积。

1.2.5 BDNF 和 p-CREB 检测 取加药后 4 d 的细胞爬片,用 0.01 mol/L PBS 轻洗涤 2~3 次,严格按照组化试剂盒说明操作标记 BDNF 和 p-CREB,其稀释浓度分别为 BDNF (1:200)和 p-CREB(1:200)。用统计学图像分析仪分别测定其光密度值。

1.2.6 数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,检查方差齐性后,各实验组与对照组比较采用单因素方差分析检验,各实验组间比较采用 LSD t 检验。

2 结 果

2.1 神经细胞的形态学观察

新生大鼠海马神经细胞接种 12~24 h 后基本完全贴壁,并开始伸出突起,3 d 后神经细胞突起增多并伸长,形成稀疏的网络。培养 5~7 d 后,神经网络建立更为完善,神经细胞胞体丰满立体感强,折光性好且光晕明显,培养 12 d 左右,细胞最丰满,可清晰看见细胞核以及核仁(图 1)。神经细胞培养 8 d 时加药,4 d 后发现各组细胞(图 2、3、4)开始退化变性,胞内出现少量空泡,光晕模糊,轴突变细,且神经网络明显稀疏。加入 LTG8、12 mg/L 组细胞变化尤其明显(图 3、图 4)。

2.2 海马神经细胞增殖活性

MTT 比色结果(表 1)显示,与对照组相比,加入 4、8 mg/L 和 12 mg/L LTG 组 4 d 后海马神经细胞增殖率均有显著降低($P<0.05$),而 LTG 不同的剂量组之间海马神经细胞增殖率无显著差异($P>0.05$)。

2.3 单个海马神经细胞胞体平均面积测定

LTG 维持稳定浓度作用于细胞 4 d 后,用图像分析仪分析不同处理条件下海马神经细胞的胞体面积,结果显示,不同剂量 LTG 组与对照组比较,海马神经细胞体积改变无显著差异($P>0.05$),不同剂量组之间比较亦无显著差异($P>0.05$)(表 2)。

2.4 BDNF 表达变化

LTG 维持稳定浓度作用于细胞 4 d 后,经 BDNF 免疫组化染色标记发现(表 3),与对照组比较,加入 LTG 4、8 mg/L 组,其总光密度值差异无统计学意义($P>0.05$);而加入 LTG12 mg/L 组总光密度值显著低于对照组 ($P< 0.01$);同时,LTG 12mg/ L 组BDNF 表达也明显低于加入 LTG 4 mg/L($P< 0.05$),LTG 8 mg/L 培养组 ($P< 0.01$)。

2.5 p-CREB 表达变化

LTG 维持稳定浓度作用于细胞 4 d 后,经 p-CREB 免疫组化染色标记发现(表 3),与对照组比

表 1 不同剂量 LTG 对海马神经细胞存活的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	吸光度 OD
对照组	0.052 3 ± 0.004 5
LTG 组 (4 mg/L)	0.031 3 ± 0.007 5*
LTG 组(8 mg/L)	0.032 0 ± 0.008 6*
LTG 组(12 mg/L)	0.027 7 ± 0.004 4*
F	4.39

表 2 不同剂量 LTG 对海马神经细胞胞体体积的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	胞体面积 μm²
对照组	2.05 ± 0.156
LTG 组 (4 mg/L)	2.09 ± 0.97
LTG 组 (8 mg/L)	2.05 ± 0.17
LTG 组 (12 mg/L)	1.98 ± 0.161
F	0.369

*:与对照组比较,$P<0.05$

表 3 不同剂量 LTG 对海马神经细胞 BDNF, p-CREB 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	BDNF	p-CREB
对照组	47 094.57 ± 1 975.806#	35 862.32 ± 2 775.680
LTG 组(4 mg/L)	39 528.19 ± 4 109.908*	30 867.40 ± 5 487.933**
LTG 组(8 mg/L)	45 950.01 ± 7 367.414#	31 189.96 ± 3 436.452#
LTG 组(12 mg/L)	23 306.64 ± 1 038.346	20 253.62 ± 4 175.613
F	5.877	6.310

*:LTG 组(12 mg/L) 与 LTG 组 (4 mg/L)BDNF 比较 $P<0.05$;** :LTG 组(12 mg/L) 与 LTG 组 (4 mg/L) p-CREB 比较 $P<0.01$;#:LTG(12 mg/L)与对照组、LTG 组 (8 mg/L) BDNF、p-CREB 比较,$P<0.01$

较,加入 LTG 4、8 mg/L 组,其总光密度值无统计学差异($P>0.05$),而加入 LTG 12 mg/L 组总光密度值显著低于对照组 ($P<0.05$)。同时,LTG 12 mg/L 组 p-CREB 表达明显低于 LTG 4 mg/L,LTG 8 mg/L 组 ($P<0.05$)。

3 讨 论

众所周知,大脑功能在一定程度上与神经细胞数量,形态和细胞间的连接密切相关,而大鼠出生时神经元和神经胶质细胞均未分化成熟,故广泛用于高级神经活动研究[4]。海马属大脑边缘系统,与感觉、运动、学习、记忆关系密切,也是癫痫发作及 AEDs 作用的关键部位, 因此为了尽量减少干扰因素,更直观的观察药物对认知功能的影响,本试验选择体外培养的新生 SD 大鼠海马神经元作为研究对象,观察加药后细胞形态及存活率变化,并探讨与细胞存活和学习记忆有关的蛋白 BDNF 及其调控因子 p-CREB 表达的变化。

本实验结果显示,无论是 4、8 mg/L 和 12 mg/L 的 LTG 均可导致体外培养神经元存活率均明显降低,而本组所用上述 3 剂量之间细胞存活率并无显著差异,提示当作用于神经元的 LTG 达到本组最低浓度(4 mg/L),即可影响神经元存活,而在本实验组所用剂量(4~12 mg/L)LTG 所导致的细胞存活率下降与其浓度无显著线性关系。进而对细胞形态的观察发现,不同浓度 LTG 对存活的细胞胞体大小无显著影响但细胞连接变化却与药物浓度有关。倒置显微镜观察发现 4 mg/L LTG 组细胞连接与正常组没有明显区别;8、12 mg/L LTG 组,细胞连接网络稀疏且 12 mg/L LTG 组神经细胞网络连接稀疏明显,推测 LTG 对体外培养的神经元存在细胞毒性,可能与添加药物后培养环境改变造成神经元急性死亡和轴突连接减少有关。

BDNF 是一种具有促进神经生长活性的蛋白质,属于神经营养素家族,主要分布于神经系统。在海马 CA1~CA4 的锥体细胞层以及齿状回的颗粒细胞层中 BDNF 含量丰富。在神经系统发育、成 D 熟过程中 BDNF 在维持神经元功能,防止神经元退行性变和神经元损伤后的再生修复具有重要意义[5,6]。我们的前期实验也发现 BDNF 是痫性发作后,海马神经元存活与功能维持的重要因子[7]。而 BDNF 对神经元的作用受 CREB 的调控,CREB 作为核内第三信使之一,存在于许多基因的启动子,这些基因包括许多可能与长时记忆 (Long-term potentiation, LTP)相关的蛋白,如 BDNF、c-fos 蛋白等。Garoflos 研究认为 CREB 磷酸化后形成的 p-CREB 可作为调控因子诱导 BDNF 基因表达,两者的表达有一致性,同时 BDNF 表达又促使 CREB 磷酸化[6,7]。因此本实验在确认 LTG 可导致海马神经元损伤的前提下,进一步对神经元内 BDNF 和 p-CREB 表达进一步观察,结果发现 LTG 浓度在 4、8 mg/L 时,培养的



图 1 正常对照组 新生大鼠海马神经元突触连接形成致密网络,胞体丰满,立体感强 10×20



图 2 LTG 4 mg/L 组 新生大鼠海马神经元光晕模糊,神经网络开始减少 10×20



图 3 LTG 8 mg/L 新生大鼠海马神经元神经轴突变细,神经网络减少 10×20



图 4 12 mg/L LTG 组;新生大鼠海马神经元神经网络明显稀疏 10×20

神经元 BDNF,p-CREB 表达改变不明显,而 LTG 浓度大于大鼠脑脊液浓度范围时,在细胞存活率下降同时还伴有 BDNF,p-CREB 表达的明显降低,推测大剂量 LTG 对神经元的损害与 BDNF,p-CREB 表达改变具有一定相关性。但并非均与海马神经元内 BDNF 和 p-CREB 表达改变有关,推测和细胞对应激的反应有关但具体机制仍需进一步探索。

现临床用药后认为 LTG 对癫痫患者认知的损害轻微,且呈剂量依赖性[1],也有动物研究报道 LTG 可减轻卒中动物模型的脑组织缺损和神经功能损伤[8]。LTG 在人类最低起效血药浓度为 1~4 mg/L,安全血药浓度尚未知,本试验发现 12 mg/L 的 LTG 可造成神经元死亡,BDNF 和 p-CREB 表达减少,推测这是高浓度 LTG 可造成认知损害的原因之一。故使用大剂量 LTG 控制癫痫时仍需密切关注癫痫患者特别是儿童患者的认知情况,以达到合理用药,避免癫痫患儿的认知功能造成进一步损害。

目前尚未见体外在细胞水平研究 LTG 对认知影响的报道,本实验以一定浓度的 LTG 作用于体外培养的神经元,能对神经细胞产生毒理作用使细胞存活率下降,可能影响海马的功能。然而由于体内外实验的差异和种属的不同,要证实 LTG 对神经元的损害和认知可能的影响,尚需进一步完善体外实验和在体研究。

参 考 文 献

[1] 陈阳美,孙红斌,王学峰,主编:癫痫治疗学[M]. 第 1 版.成都: 四川出版社,2004.89-91.

[2] Walker M C, Tong X, Perry H. Comparison of serum, cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid pharmacokinetics of lamotrigine [J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 130(2): 242 - 248.

[3] Castel-Branco M, Lebre V, Falcao A C, et al. Relationship between plasma and brain levels and the anticonvulsant effect of lamotrigine in rats [J].European Journal of Pharmacology, 2003, 482(1-3): 163-168.

[4] 刘新颖, 安志兴, 吴月红. 维生素 C 对新生大鼠海马神经细胞生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 6(33): 31-34.

[5] 赵耀东,缪竞诚.脑源性神经生长因子(BDNF)与神经性疾病[J]. 中华临床医学杂志, 2005, 6(8): 51-54.

[6] Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on p-CREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus [J].Brain Research, 2005, 1052(2): 187-195.

[7] 胡 越,蒋 莉,张晓萍.持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素[J].第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1663-1665.

[8] 彭静玉,李光来. 拉莫三嗪对脑缺血的神经保护作用[J].国外医学脑血管疾病分册, 2005, 13(11): 843-846.

(责任编辑:关蕴良)